



СКОЛИОТИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ: ОТЧЕТ УЧИТЕЛЮ

А.М. Зайдман

*Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии
им. Я.Л. Цивьяна, Новосибирск, Россия*

С благодарностью посвящаю свой труд учителю — Я.Л. Цивьяну, который не только предоставил тему для исследования, но и на своем примере человека, преданного делу, воспитал поколение учеников, жизнь и наука для которых неотделимы. В статье представлены итоги многолетних исследований идиопатического сколиоза в виде отчета учителю. Рассмотрено несколько основополагающих тем:

- 1) впервые в мировой практике на основании исследования 50 больных идиопатическим сколиозом установлено, что этиологическим фактором сколиоза является эктопическая локализация в пластинке роста тела позвонка производных нервного гребня, генетически не детерминированных к хондрогенной дифференцировке и процессу роста;
- 2) локальное нарушение хондрогенеза в пластинке роста тела позвонка является причиной асимметрии роста и формирования деформации позвоночника при идиопатическом сколиозе;
- 3) степень структурных изменений позвоночника и прогноз прогрессирования деформации зависят от уровня нарушений роста тела позвонка, заложенных в эмбриогенезе;
- 4) на созданной модели идиопатического сколиоза путем ингибирования гена *PAX3* в курином эмбрионе предполагается подтвердить предложенные гипотезы и получить ответы еще на многие неясные вопросы в сколиотической болезни.

Ключевые слова: идиопатический сколиоз, пластинки роста тел позвонков, протеогликан, модель сколиоза.

Для цитирования: Зайдман А.М. Сколиотическая болезнь: отчет учителю // Хирургия позвоночника. 2020. Т. 17. № 3. С. 117–133.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14531/ss2020.3.117-133>.

SCOLIOTIC DISEASE: REPORT TO THE TEACHER

A.M. Zaidman

Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, Russia

It is with gratitude that I dedicate my work to the teacher, Ya.L. Tsivyan, who not only provided a subject for research, but also, on his own example of a person devoted to his work, brought up a generation of scholars for whom life and science are inseparable.

The paper presents the results of many years of research on idiopathic scoliosis in the form of a report to the teacher. Several fundamental topics were considered:

- 1) for the first time in world practice, it was established, on the basis of a study of 50 patients with idiopathic scoliosis, that the etiological factor of scoliosis is ectopic localization of neural crest derivatives, which are not genetically determined to chondrogenic differentiation and the growth process, in the vertebral body growth plate;
- 2) a local disturbance of chondrogenesis in the vertebral body growth plate is the cause of the growth asymmetry and formation of spinal deformity in idiopathic scoliosis;
- 3) the degree of structural changes in the spine and the prognosis of the deformity progression depend on the level of disturbance of the morphogenetic processes in the vertebral body growth plate embedded in embryogenesis;
- 4) it is supposed to confirm the proposed hypotheses by inhibition of the *PAX3* gene in the chick embryo model of idiopathic scoliosis and to get answers to many more unclear questions concerning scoliotic disease.

Key Words: idiopathic scoliosis, vertebral body growth plates, proteoglycans, scoliosis model.

Please cite this paper as: Zaidman AM. Scoliotic disease: report to the teacher. Hir. Pozvonoc. 2020;17(3):117–133. In Russian.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14531/ss2020.3.117-133>.

*Наука не является и не будет являться закрытой книгой.
Каждый важный успех приносит новые вопросы, всякое развитие
обнаруживает со временем все новые и глубокие трудности.*

А. Эйнштейн

Все началось с диалога. Профессор Я.Л. Цивьян: «Есть такая болезнь, сколиотическая болезнь. Очень трудная. Совсем неисследованная. Все гистологи отказались. Возьмешься? Тебе это под силу». Младший научный сотрудник А.М. Зайдман: «Сколиотическая болезнь? Конечно, возьмусь! Хотела у вас попросить эту тему». Профессор Я.Л. Цивьян: «Завтра оперирую. Подготовься. Будешь ассистировать и исследовать все, что удаляется. Надо найти причину. Это твой путь».

Так начался новый этап лечения идиопатического сколиоза, внедренный в ортопедическую практику профессором Я.Л. Цивьяном, а для меня это стало исследованием длиною в жизнь.

Изучалось все, что в процессе операции удалялось: костная ткань, межпозвонковые диски, пластинки роста, мышечная ткань и т.д. Оперировали врожденный, идиопатический и паралитический сколиозы. Периодически учитель задавал вопрос: «Что-нибудь нашла?». И однажды: «Да, нашла». Это была пластинка роста, которая впервые указала путь исследований за эти долгие годы: десять экспериментальных моделей, генетические исследования идиопатического сколиоза и болезни Шейерманна, майоргенная зависимость и, в конце концов, клетки нервного гребня в пластинки роста. «Кажется, нашла...».

Со времен глубокой древности до наших дней предложено множество гипотез идиопатического сколиоза. Каждый этап исследований соответствовал уровням развития общества и методическим возможностям. Ни одна из теорий, в том числе и генетическая, не раскрыла сущности идиопатического сколиоза. Ошибочно было бы считать, что исследования прошлых лет не являлись вкладом в учение об идиопатическом сколиозе. Каждая гипотеза была основой переосмысления и продолжения поиска на новом уровне знаний. Несмотря на значительный прогресс в науке, по-прежнему каждая статья, посвященная идиопатическому сколиозу, и в наши дни начинается с предложения: «Этиология и патогенез идиопатического сколиоза остаются неизвестными». Почему? Вероятной причиной является подход (метод) поиска этиологического фактора идиопатического сколиоза. Позволю себе остановиться более подробно на концепциях, в основу которых, кроме большого количества факторов (исследовать последовательность которых просто невозможно), положен дисбаланс роста костно-нервной системы [1, 2]. Действительно, в процессе формирования скелета позвоночника и спинного мозга на этапах эмбриогенеза и в постнатальном периоде существует периодизация (как и во всех других структурах) роста. До трех месяцев развития человека (у животных периодизация разная, но процессы однотипны) спинной мозг полностью располагается в позвоночном канале и обе

структуры (позвоночный канал и спинной мозг) имеют одинаковый продольный размер. Это соответствует уровню и потребностям развития эмбриона. После трех месяцев происходит рост пояснично-крестцового отдела позвоночника – этап формирования *Cauda equina* как у человека, так и всех млекопитающих. В результате спинной мозг поднимается вверх со своими корешками, которые в процессе роста образуют конский хвост, иннервирующий сформированные таз и конечности. Реализуются первые движения эмбриона. Поясничный отдел позвоночника лордозится. Грудной отдел позвоночника в процессе дисбаланса роста участия не принимает, но по законам биомеханики формируется легкий кифоз. Это достаточно медленный процесс формирования фигуры человека (статит) и всех животных. У последних сколиотических изменений позвоночника вследствие дисбаланса роста не происходит. Почему в грудном отделе идет формирование торсии? Так называемый дисбаланс роста позвоночника и спинного мозга – это эволюционно генетически и консервативно закрепленный механизм, в результате которого формируется устойчивая структурная композиция тела животных и человека. Эта композиция обеспечивает определенный диапазон движений как в трудовой сфере, так и при создании шедевров в разных сферах искусства. Громадный опыт работы автора, клинициста и исследователя, позволил рассмотреть проблему идиопатического сколиоза с общепатологической точки зрения.

Идиопатический сколиоз – это болезнь, сколиотическая болезнь. Термин «сколиотическая болезнь» был предложен моим учителем Я.Л. Цивьяном. Каждая болезнь характеризуется следующим: 1) локализацией процесса; 2) патологическим субстратом; 3) первопричиной – этиологическим фактором болезни. Локальный фактор при идиопатическом сколиозе – это пластинка роста. Многолетние исследования (более 50 лет) структурных компонентов позвоночника (более 1000 препаратов) показали, что в пластинке роста тела позвонка на вогнутой стороне деформации локализуются малодифференцированные хондробласты, которые не проходят соответствующих стадий дифференцировки, что приводит к нарушению роста. На выпуклой стороне деформации процесс гистогенеза соответствует контролю (не изменен). Следовательно, локализация процесса – пластинка роста. Субстрат – малодифференцированные клетки (хондробласты). Нарушение дифференциации и пролиферации клеток – причина асимметрии роста и формирования деформации позвоночника. Исследование причины асимметрии роста представлено в следующих разделах статьи. Подобный подход был новой стадией исследования в поиске этиологии идиопатического сколиоза.

Анализ экспрессии генов в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом

Несмотря на многочисленные исследования и большой объем полученных данных, генетические механизмы заболева-

ния остаются невыясненными. При этом выявление генов, гипер- или гипоекспрессия которых приводит к развитию идиопатического сколиоза или ассоциирована с идиопатическим сколиозом, открыло бы пути для ранней диагностики, прогноза, профилактики и, возможно, коррекции патологии современными методами молекулярной биологии, например, редактированием геномов (CRISPR) [3].

В совместном исследовании Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии и Института цитологии и генетики СО РАН выявлено, что идиопатический сколиоз – генетически зависимая деформация позвоночника, связанная с ней мутация в основном гене. Показано, что при отсутствии мутации деформация не развивается [4]. Следовательно, больные идиопатическим сколиозом являются носителями мутантного гена, дисфункция которого приводит к нарушению роста позвоночника. Морфологические и биохимические исследования [7] при идиопатическом сколиозе свидетельствуют, что патогенетическим механизмом формирования деформации позвоночника является асимметрия роста. Можно предположить, что в основе асимметрии роста лежит нарушение генетической регуляции роста позвоночника на вогнутой стороне деформации. Я позволю себе остановиться на самых основных исследованиях и не касаться длинного пути поиска истины.

В постнатальном периоде тело позвонка подвергается остеогенезу, за исключением узкой хрящевой пластинки (пластинки роста), за счет которой осуществляется рост позвонков. Этот рост происходит благодаря пролиферации, дифференцировке малодифференцированных хондробластов в гипертрофический хондроцит и последующему остеогенезу [8]. Поскольку пластинка роста непосредственно участвует в росте позвонка, логично исследовать экспрессию генов в пластинке роста, то есть в области локализации патологии, тогда как в большинстве генетических исследований для анализа используют кровь больных [9, 10]. В связи с этим предпринято исследование экспрессии генов в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом, у которых признаки заболевания выражены наиболее ярко.

Основанием для выбора генов, регулирующих функционирование пластинки роста тела позвонка при идиопатическом сколиозе, явились полученные биохимические и морфологические данные о нарушении структурной организации клеток и матрикса пластинки роста на вогнутой стороне деформации позвоночника. Вогнутая сторона деформации пластинки роста лишена зональной структуры и представлена беспорядочно расположенными малодифференцированными хондробластами на фоне дистрофически измененного матрикса. Структура пластинки роста на выпуклой стороне деформации сохранена, колонковый слой представлен высокодифференцированными клетками (рис. 1).

Методом ПЦР в режиме реального времени исследовали экспрессию 17 генов. В число этих генов входили *TGFR1*, *EGFR*, *IGF1R*, *GHR*, принимающие участие в процессе регуля-

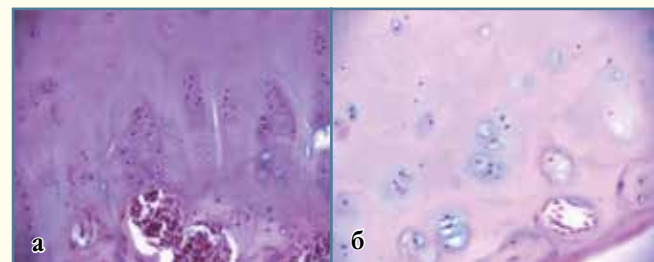


Рис. 1

Пластинка роста тела позвонка больного идиопатическим сколиозом III–IV ст.: **а** – выпуклая сторона деформации: структура пластинки роста сохранена, колонковый слой представлен высокодифференцированными клетками; позитивная Хейл-реакция свидетельствует о высокой полимерности протеогликанов в цитоплазме и матриксе; 20 × 10; **б** – вогнутая сторона деформации: нарушение зональности, беспорядочное расположение малодифференцированных клеток; незначительно выраженная Хейл-реакция; 20 × 10

ции роста позвоночника, *SOX9*, *PAX1*, *PAX9*, *INH*, регулирующие процесс хондрогенной дифференцировки, *ACAN*, *LUM*, *VCAN*, *COL1A1*, *COL2A1*, *HAPLN1*, определяющие структурно-функциональные особенности матрикса хряща, и гены сульфатирования протеогликанов *SLC26A2*, *CHST1*, *CHST3*, то есть процесса принципиально важного для формирования внеклеточного матрикса.

Исследование экспрессии генов, участвующих в процессе регуляции роста позвоночника, выявило высокий уровень мРНК гена рецептора трансформирующего фактора роста (*TGFR1*) в сколиозных хондробластах по сравнению с контролем ($P < 0,05$; рис. 2). *TGFR1* – это протеогликан мембраны, функционирует как ко-рецептор с TGF-рецептором. Внутриклеточные субстраты активированных рецепторов участвуют в транскрипционной регуляции генов, вовлеченных в формирование хряща и кости [11, 12]. Основная роль TGF β в хрящевой ткани заключается в отрицательной регуляции дифференцировки хондроцитов.

Уровень мРНК гена *EGFR* в сколиозных образцах оказался выше контрольных значений (рис. 2). *EGFR* – это белок поверхности клетки, который связывает эпидермальный фактор роста. Ген рецептора эпидермального фактора роста осуществляет позитивную регуляцию пролиферации клеток. *EGFR*-сигнализация играет важную роль в ремоделировании внеклеточного матрикса хряща протеогликанов в кость в процессе энхондрального остеогенеза. Уменьшение уровня экспрессии *EGFR* приводит к уменьшению ответа клеток на EGF, нарушает дифференцировку клеток протеогликанов и в результате приводит к замедлению роста [13].

Экспрессия гена рецептора гормона роста (*GHR*), функция которого заключается в позитивной регуляции дифференцировки клеток [14], в сколиозных клетках была ниже по сравнению с контрольными хондробластами (рис. 2).

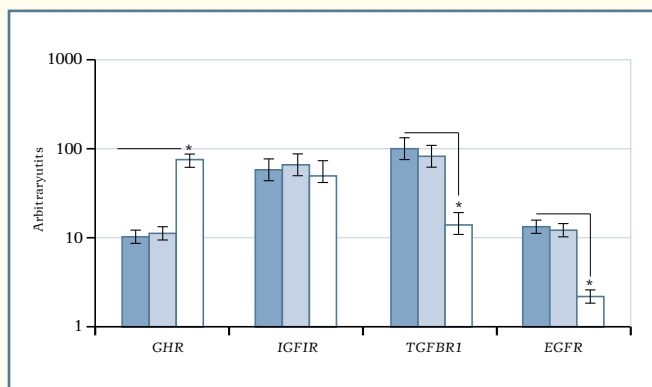


Рис. 2

Относительный уровень экспрессии генов, участвующих в процессе регуляции роста позвоночника, в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом и хондробластах позвоночника эмбриона: синие столбики – выпуклая сторона деформации, голубые столбики – вогнутая сторона деформации, белые столбики – контроль (позвоночник эмбриона). Данные представлены в виде среднего значения \pm SD; *достоверные различия между образцами больных сколиозом и контрольными образцами ($P < 0,05$). Относительный уровень экспрессии рассчитывался по отношению к гену GAPDH

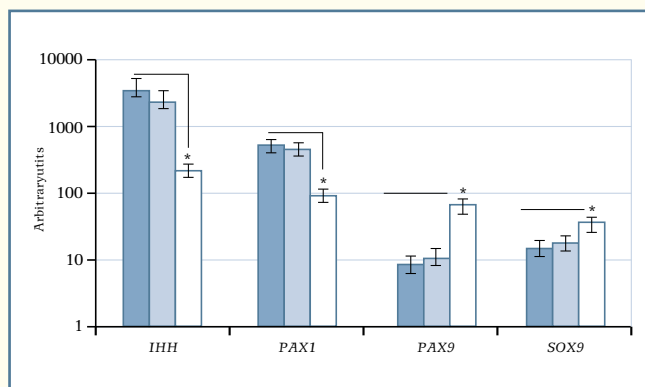


Рис. 3

Относительный уровень экспрессии генов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки, в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом и хондробластах позвоночника эмбриона: синие столбики – выпуклая сторона деформации, голубые столбики – вогнутая сторона деформации, белые столбики – контроль (позвоночник эмбриона). Данные представлены в виде среднего значения \pm SD; *достоверные различия между образцами больных сколиозом и контрольными образцами ($P < 0,05$). Относительный уровень экспрессии рассчитывался по отношению к гену GAPDH

Поскольку гормон роста является одним из ключевых гормонов, регулирующих метаболизм клеток хрящевой ткани, это может свидетельствовать о пониженной интенсивности метаболизма в клетках при идиопатическом сколиозе.

Таким образом, нарушение процессов дифференцировки хондробластов в пластинке роста тела позвонка при сколиотической болезни может быть обусловлено высоким уровнем экспрессии гена рецептора *TGF* и низким уровнем мРНК гена *GHR*. То есть в клетках пластинки роста наблюдается замедление дифференцировки, метаболизма и роста, что согласуется с результатами морфологических исследований. Повышение уровня экспрессии гена *EGFR*, вероятно, способствует пролиферации хондроцитов, а одновременное изменение экспрессии генов *TGFRI* и *GHR* приводит к накоплению малодифференцированных клеток и/или нарушению дифференцировки клеток пластинки роста. Низкий уровень экспрессии *EGFR* в контрольных хондробластах, по сравнению с хондробластами больных сколиозом, возможно, связан с периодом эмбрионального развития, когда процесс эндохдрального остеогенеза еще не начался и активной пролиферации клеток ростовой пластинки не требуется. Уровень экспрессии гена рецептора инсулинозависимого фактора роста (*IGF1R*) в клетках больных сколиозом и в контрольных образцах был одинаков (рис. 2). *IGF1R* действует непосредственно на инсулиноподобный фактор роста 1, который продуцируется пролиферирующими и гипертрофическими хондроцитами, и индуцирует их пролиферацию [15]. Поскольку для гена

IGFR не было обнаружено достоверных отличий уровня экспрессии в хондробластах больных сколиозом, можно предположить, что *IGFR* не вовлечен в нарушения пролиферации клеток пластинки роста.

Анализ экспрессии генов, регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки, показал, что уровень экспрессии генов *PAX1* и *IHH* в клетках пластинки роста больных сколиозом достоверно выше, а уровень экспрессии генов *SOX9* и *PAX9* ниже по сравнению с контрольными образцами (рис. 3). Транскрипционный фактор *SOX9* экспрессируется как в эмбриональном периоде (в хрящевых уплотнениях), так и на более поздних стадиях в хондроцитах пластинки роста. *SOX9* принимает участие в процессе хондрогенеза, индуцируя дифференцировку хондробластов и эндохдральный остеогенез [16, 17]. Одной из его регуляторных целей является *COL2A1* – ген, кодирующий основной коллаген в хряще [18]. Таким образом, нарушение дифференцировки хондроцитов в пластинке роста при сколиозе может быть связано с низким уровнем экспрессии гена *SOX9*.

PAX – это семейство генов, кодирующих ДНК-связывающие белки, которые являются внутриядерными факторами транскрипции. Гены *PAX1* и *PAX9* играют критическую роль в образовании осевого скелета во время эмбрионального развития, контролируют процессы дифференцировки и пролиферации клеток на ранней стадии формирования склеротома [19]. Важную роль в хондрогенной дифференциации клеток склеротома играет уровень экспрессии генов

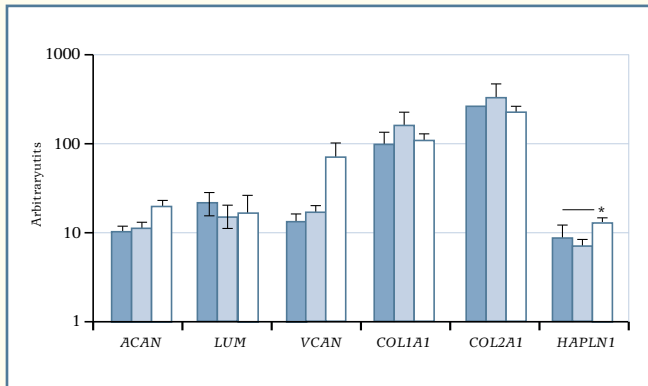


Рис. 4

Относительный уровень экспрессии генов, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща, в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом и хондробластах позвоночника эмбриона: синие столбики – выпуклая сторона деформации, голубые столбики – вогнутая сторона деформации, белые столбики – контроль (позвоночник эмбриона). Данные представлены в виде среднего значения \pm SD; * достоверные различия между образцами больных сколиозом и контрольными образцами ($P < 0,05$). Относительный уровень экспрессии рассчитывался по отношению к гену GAPDH

PAX1 и *PAX9* [20]. Поскольку рассматриваемые гены действуют взаимозависимо, а в хондробластах больных сколиозом выявлена пониженная экспрессия гена *PAX9* при значительном повышении экспрессии гена *PAX1* ($P < 0,05$), это может указывать на нарушение регуляции генов хондрогенной дифференцировки.

Ген *INH* в норме экспрессируется в прегипертрофических хондроцитах и играет ключевую роль в дифференциации хондроцитов пластинок роста [21]. Посредством обратной связи он регулирует паратиреоидный гормон-связанный пептид (PTHrP), который, в свою очередь, подавляет дифференциацию пролиферирующих хондроцитов. Причем *INH* индуцирует синтез PTHrP, тем самым косвенно замедляя процесс гипертрофии хондроцитов и сохраняя клетки в негипертрофическом пролиферативном состоянии [22]. Путь *INH* – пептид, связанный с паратиреоидным гормоном, является одним из двух основных сигнальных путей, которые контролируют пролиферацию и дифференцировку хондроцитов. Таким образом, нарушение процесса дифференцировки хондроцитов в пластинке роста тела позвонка при сколиотической болезни может быть обусловлено особенностями экспрессии генов-регуляторов хондрогенной дифференцировки: повышенным уровнем гена *INH*, низким уровнем гена *SOX9*, нарушением взаимодействия генов *PAX1* и *PAX9*.

В результате исследования экспрессии генов, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща, обнаружено, что уровень мРНК генов, кодиру-

ющих синтез основных протеогликанов хрящевой ткани (*ACAN*, *LUM*, *VCAN*) и генов коллагенов типов I и II (*COL1A1*, *COL2A1*) в сколиозных и контрольных образцах, достоверно не различается (рис. 4). Ген *ACAN*, имеющий альтернативные транскрипционные варианты, кодирует аггрекан – самый представительный хондроитинсульфат-связанный протеогликан, составляющий основную часть внеклеточного матрикса в хрящевой ткани. Аггрекан участвует в связывании гиалуроновой кислоты и белков и вместе с коллагеном типа II формирует матрикс хряща [16]. Версикан (кодируется геном *VCAN*) – большой хондроитинсульфат-связанный протеогликан – также представлен во внеклеточном матриксе, принимает участие в связывании гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты, вовлечен в адгезию, пролиферацию и миграцию клеток. Ген *LUM* кодирует главный кератансульфат-связанный протеогликан – люмикан, который относится к семейству лейцин-богатых протеогликанов. Люмикан является составной частью структурного внеклеточного матрикса и осуществляет связывание коллагена, организацию и регуляцию коллагеновых фибрилл. Формирующий фибриллы коллаген типа I характерен для мало дифференцированной хрящевой ткани и преимущественно представлен в кости и сухожилиях. Коллаген типа I является составной частью структурного внеклеточного матрикса и участвует в энхондральной оссификации. Ген *COL2A1* кодирует альфа-1 цепь коллагена типа II, специфичного для зрелой хрящевой ткани. Являясь важнейшей составной частью внеклеточного матрикса, коллаген типа II имеет существенное значение для нормального функционирования хрящевой ткани, обеспечивая ее прочность и эластичность [23, 16]. Поскольку различия в экспрессии генов коллагенов и генов, кодирующих протеогликанов матрикса хряща, в сколиозных и в контрольных образцах не обнаружено, можно предположить, что нарушений в функционировании рассматриваемых генов при сколиозе не происходит.

Уровень мРНК гена *HAPLN1* в сколиозных клетках оказался ниже по сравнению с контролем. Низкий уровень экспрессии гена *HAPLN1* может свидетельствовать о снижении полимерности протеогликанов в пластинке роста при идиопатическом сколиозе (продукт гена *HAPLN1* связывает остатки гиалуроновой кислоты [24], что согласуется с морфологическими данными (низкое полимерное состояние протеогликанов) [7].

Биохимические данные [7] о нарушении синтеза гликозаминогликанов в пластинке роста тела позвонка на вогнутой стороне деформации у детей, больных сколиозом, явились основанием для исследования генов, кодирующих процесс сульфатирования протеогликанов: гена сульфотрансферазы 1 (*CHST1*), сульфотрансферазы 3 (*CHST3*) и гена трансмембранного транспорта сульфатов (*SLC26A2*). Показано, что недостаточное сульфатирование протеогликанов может происходить из-за инактивации генов, кодирующих переносчиков сульфатов, в результате нарушается как структура матрикса, так и процесс роста [25]. Нарушения в процессе сульфатирования протеогликанов могут приводить к раз-

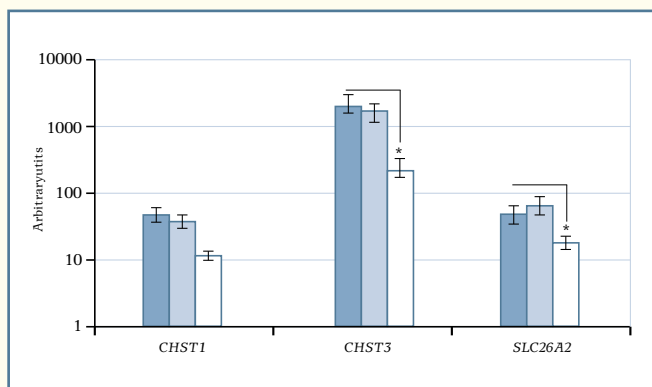


Рис. 5

Относительный уровень экспрессии генов сульфатирования протеогликанов в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом и хондробластах позвоночника эмбриона: синие столбики – выпуклая сторона деформации, голубые столбики – вогнутая сторона деформации, белые столбики – контроль (позвоночник эмбриона). Данные представлены в виде среднего значения \pm SD; *достоверные различия между образцами больных сколиозом и контрольными образцами ($P < 0,05$). Относительный уровень экспрессии рассчитывался по отношению к гену *GAPDH*

личным патологиям [26]. Анализ экспрессии генов, участвующих в сульфатировании протеогликанов, показал, что уровни мРНК генов *CHST3* и *SLC26A2* в образцах, полученных от больных сколиозом, выше, а уровень экспрессии гена *CHST1* не отличается от контроля (рис. 5). Переносчик сульфатов (*SLC26A2*) – это трансмембранный гликопротеин, вовлеченный в патогенез нескольких хондродисплазий. *SLC26A2* играет критическую роль в сульфатировании протеогликанов хряща и организации матрикса, обеспечивая транспорт сульфатов в хондроциты и адекватное сульфатирование. Отмеченное ранее нарушение сульфатирования протеогликанов [7] с вогнутой стороны деформации при идиопатическом сколиозе противоречит высокой экспрессии гена *SLC26A2*. Вполне вероятно, что нарушение сульфатирования происходит не на этапе транспорта сульфата. *CHST3* кодирует фермент, который катализирует сульфатирование хондроитина протеогликанов, находящихся во внеклеточном матриксе и большинстве клеток в состоянии дифференцировки. Данные, полученные с помощью биохимических методов, об уменьшении количества хондроитинсульфатов на фоне увеличения кератансульфатов на вогнутой стороне деформации при сколиотической болезни [7] не согласуются с данными об уровне экспрессии генов *CHST1* и *CHST3*. Вполне возможно, что регуляция функции этих генов осуществляется на уровне транскрипции и/или в этих клетках активированы и гены, осуществляющие альтернативные реакции.

Полученные данные по экспрессии всех исследуемых генов были подвергнуты статистическому анализу. Прове-

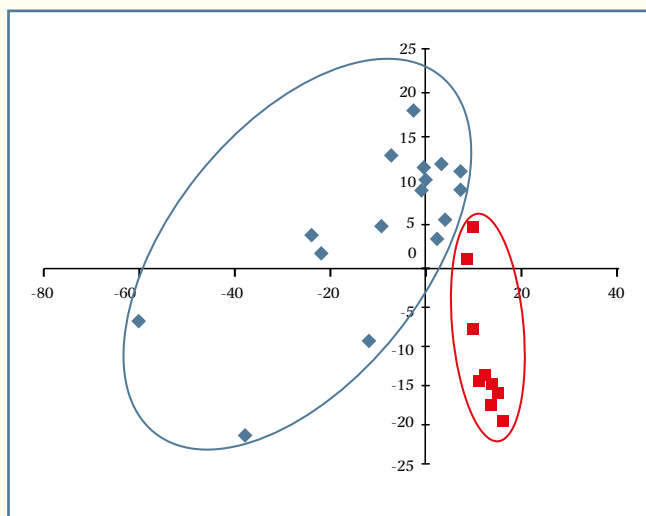


Рис. 6

Результаты факторного анализа: профили экспрессии генов, участвующих в процессе регуляции роста позвоночника (*TGFR1*, *EGFR*, *IGF1R*, *GHR*), регулирующих процесс хондрогенной дифференцировки (*SOX9*, *PAX1*, *PAX9*, *IHH*), определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща (*ACAN*, *LUM*, *VCAN*, *COL1A1*, *COL2A1*, *HAPLN1*), и генов сульфатирования протеогликанов (*SLC26A2*, *CHST1*, *CHST3*) в хондробластах пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом III–IV ст. (синий цвет) и хондробластах позвоночника эмбриона (красный цвет) имеют достоверные различия ($P < 0,01$); по вертикали и по горизонтали факторные координаты переменных, основанные на корреляциях

денный факторный анализ показал принципиальное отличие в профиле экспрессии генов при идиопатическом сколиозе относительно контрольной группы (рис. 6).

Морфогенез любой ткани определяется экспрессией соответствующих генов. Нарушение взаимодействия генов или сбой в цепи «ген – конечный продукт» приводит к образованию аномальных структур [8]. Строение хрящевой ткани, равно как и энхондральная оссификация, определяются согласованным функционированием клеток и матрикса, состоящего из коллагеновых волокон и протеогликанов, зависящих от экспрессии генов, регулирующих синтез, транспорт и присоединение составных частей молекул протеогликанов. Анализ экспрессии генов, определяющих структурно-функциональные особенности матрикса хряща, показал отсутствие различий в уровнях мРНК генов в контроле и при сколиозе. В клетках протеогликанов тел позвонков, как и в клетках позвоночника эмбриона, экспрессируются гены, кодирующие главные компоненты матрикса хряща (агрекан, версикан, люмикан, коллаген типа II). Полученные данные находятся в согласии с тем фактом, что пластинка роста – это участок хрящевой ткани, представленный межклеточным веществом и хондробластами разной степени дифференцировки, причем доля мало-

дифференцированных клеток достаточно высока, о чем свидетельствует высокий уровень коллагена типа I. Полученные данные подтверждают тот факт, что пластинка роста представляет собой дериват эмбрионального хряща, все процессы дифференцировки клеток в пластинке роста являются продолжением эмбрионального морфогенеза в постнатальном периоде, что делает допустимым использование клеток позвоночника эмбриона в качестве контроля [27].

Анализ экспрессии генов, регулирующих дифференцировку и функционирование хондробластов и компонентов внеклеточного матрикса пластинки роста тела позвонка больных идиопатическим сколиозом III–IV ст., выявил гены, экспрессия которых не отличается от контроля. Следовательно, можно предположить, что выявленные нарушения при сколиотической болезни не связаны с функционированием генов *IGF1R*, *ACAN*, *LUM*, *VCAN*, *COL1A1*, *COL2A1*, *CHST1*. С другой стороны, определены гены с повышенным или пониженным уровнем экспрессии при сколиозе. Из морфологических данных (рис. 1) следует, что на вогнутой стороне деформации позвоночника структурная организация клеток и матрикса пластинки роста резко изменена, наблюдаются нарушение зональности, беспорядочное расположение редких малодифференцированных хондробластов, отсутствие пролиферативной активности и синтетических потенций, дистрофические изменения матрикса. Подобные изменения могут быть обусловлены снижением экспрессии генов *GHR*, *PAX9* и *SOX9*, играющих ключевые роли в дифференцировке хондробластов. Снижение степени сульфатирования протеогликанов [7], вероятно, обусловлено низким уровнем экспрессии гена *HAPLN1* при сколиозе. Высокий уровень экспрессии генов *TGFR1* и *EGFR* по сравнению с контролем и гипоекспрессия *SOX9* и *GHR* свидетельствуют о нарушении нормального функционирования рецепторов ростовых и транскрипционных факторов в сколиозных клетках. Наблюдаемая разбалансировка может указывать на недостаток ростовых факторов или молекул посредников, а также может быть связана с формированием клеток смешанного фенотипа, не реагирующих на нормальные сигналы дифференцировки.

Среди всех исследуемых генов при сколиозе особое место занимают гиперэкспрессированные гены *CHST3*, *PAX1* и *INH*. Вклад этих генов в развитие патологических изменений в пластинке роста тела позвонка при идиопатическом сколиозе кажется наиболее значимым. Несбалансированная экспрессия генов *PAX*, вероятно, приводит к нарушению хондрогенной дифференцировки клеток, а *INH* замедляет процесс гипертрофии хондроцитов, сохраняя клетки в негипертрофическом пролиферативном состоянии. Тем самым можно объяснить характерную морфологическую картину на вогнутой стороне деформации при идиопатическом сколиозе.

Другим ключевым моментом при сколиотической болезни является нарушение сульфатирования протеогликанов в пластинке роста. Так как в последнее время подчеркивается важность гена *CHST3* в заболеваниях опорно-двигатель-

ного аппарата [28], нельзя исключать его влияние на развитие сколиоза. Поскольку сульфатирование протеогликанов регулируется комплексом генов, а при сколиозе наблюдаются нарушения экспрессии генов *CHST3* и *SLC26A2* по сравнению с контролем, можно предположить, что происходит рассогласование функционирования главных генов сульфатирования. Это приводит к синтезу сульфатсодержащих групп, не связанных с гиалуроновой кислотой, и в конечном итоге – к низкому полимерному состоянию протеогликанов.

Комплексный анализ 17 генов не выявил нарушений в экспрессии генов, кодирующих синтез коллагенов и протеогликанов пластинки роста тела позвонка при идиопатическом сколиозе. В то же время были обнаружены гены, экспрессия которых нарушена при сколиотической болезни. Сбои в функционировании генов дифференцировки хондроцитов (*PAX1*, *PAX9*, *INH*), рецепторов транскрипционных и ростовых факторов роста (*SOX9*, *TGFR1*, *GHR*) и генов сульфатирования протеогликанов (*SLC26A2*, *CHST3*) приводят к появлению характерных морфологических и функциональных изменений в пластинке роста тела позвонка на вогнутой стороне деформации при сколиозе. Выявленные нарушения морфогенеза и роста могут свидетельствовать о наличии клеток иного фенотипа, не характерных для исследуемой ткани и не способных реагировать на сигналы дифференцировки. Подтверждением данного заключения служит факторный анализ, который демонстрирует, что клетки пластинки роста и контрольные хондробласты формируют отдельные группы, то есть принципиально различаются по экспрессии исследуемых генов (рис. 6).

Таким образом, выявлен профиль экспрессии генов, характерный для хондроцитов пластинки роста тела позвонка при выраженной форме идиопатического сколиоза: дисбаланс генов хондрогенной дифференцировки, рецепторов ростовых и транскрипционных факторов роста

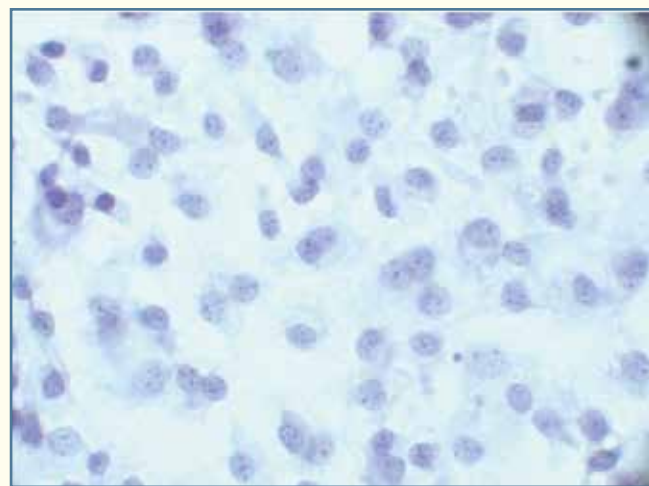


Рис. 7

Монослой культивированных хондробластов (выпуклая сторона деформации позвоночника); гематоксилин-эозин, 10 × 60

и генов, участвующих в сульфатировании протеогликанов. Полученные данные согласуются с морфологическими и биохимическими результатами и могут являться маркерами патологии.

Факторный анализ выявил выраженные отличия фенотипа хондробластов пластинки роста у больных идиопатическим сколиозом. Эти клетки не воспринимают сигналов факторов роста и гормона роста. Возникла необходимость идентифицировать фенотип этих клеток. Идентификация клеток проводилась методом культивирования, так как известно, что клетки в культуре проходят ранние стадии морфогенеза. Следующим этапом исследования явилась идентификация клеток пластинок роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом [29].

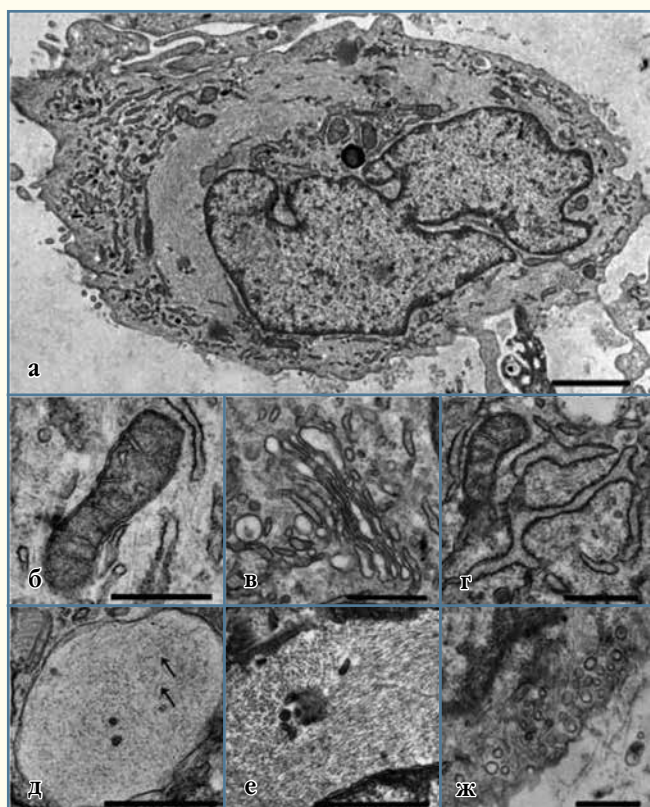


Рис. 8

Ультраструктура хондробласта с выпуклой стороны пластинки роста тела позвонка на вершине деформации больного идиопатическим сколиозом: **а** – общий вид клетки, содержащей ядро с инвагинациями и большое скопление промежуточных филаментов в цитоплазме; **б, в** – митохондрии с короткими поперечными кристами, узкие (**б**) и расширенные (**в**) цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума; **г** – диктиосомы аппарата Гольджи; **д** – вакуоль с короткими тонкими филаментами (стрелки) внутри; **е** – скопление промежуточных филаментов вблизи ядра; **ж** – многочисленные везикулы вблизи плазматической мембраны клетки; масштаб: **а** – 2 мкм, **б–ж** – 0,5 мкм

Эктопическая локализация клеток нервного гребня – этиологический фактор сколиотической болезни

Фактические данные показали, что в пластинках роста тел позвонков больных идиопатическим сколиозом в зависимости от локализации выявлены клетки разных фенотипов. Культивированные клетки пластинки роста выпуклой стороны деформации идентифицированы как хондробласты (рис. 7). Критериями оценки хондрогенной дифференцировки клеток служили морфологическая структура, в том числе ультраструктурная организация (рис. 8), синтез органоспецифических протеогликанов и экспрессия генов, сопряженных с процессом роста (рис. 9) [30].

Культивированные клетки, выделенные из пластинок роста вогнутой стороны деформации позвоночника больных идиопатическим сколиозом, идентифицированы как нейро- и глиобласты (рис. 10). Морфологически нейробласты – это мульти-, уни-, биполярные и псевдоуниполярные клетки, формирующие множественные контакты как с отростками, так и с телами клеток. В цитоплазме клеток определялась субстанция Ниссля (рис. 11) и экспрессировались нейроспецифические белки β III-тубулин, *NF1* и *NF200* (рис. 12).

О нейральном генезе исследованных клеток свидетельствовали данные электронной микроскопии: протяженная сеть нейрофиламентов, формирующиеся и сформированные синусы с везикулами, характерные вытянутые митохондрии. В отростках и телах клеток располагались многочисленные аксонные холмики-шипики, содержащие везикулы (рис. 13). Между отростками и клетками выявлялись множественные контакты. Второй тип – это клетки округлой формы, содержащие большое количество отростков, фор-

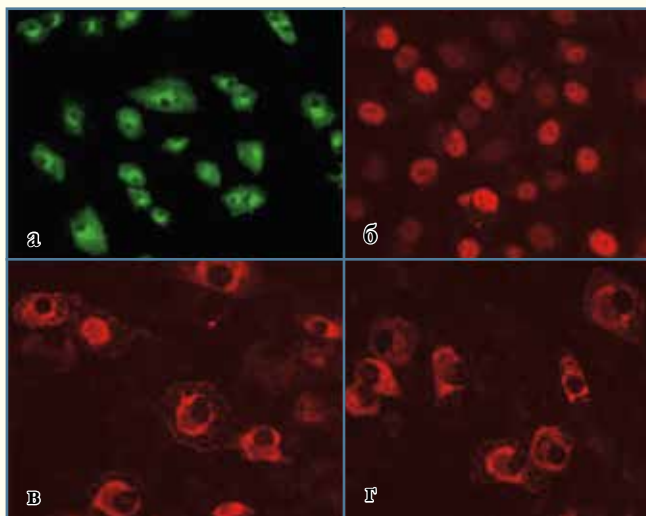
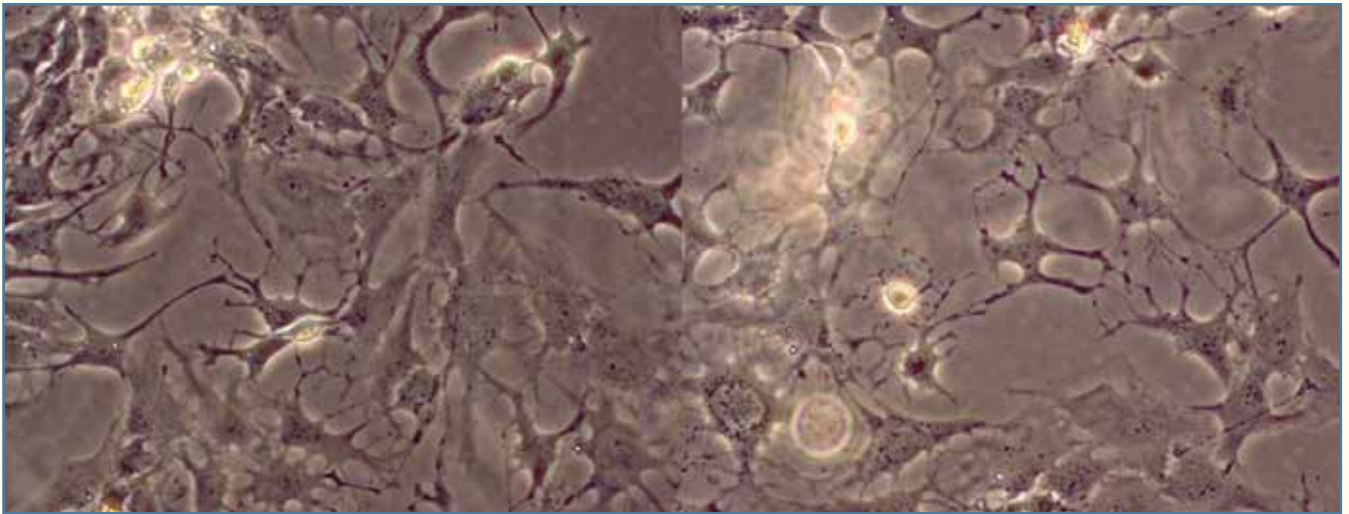
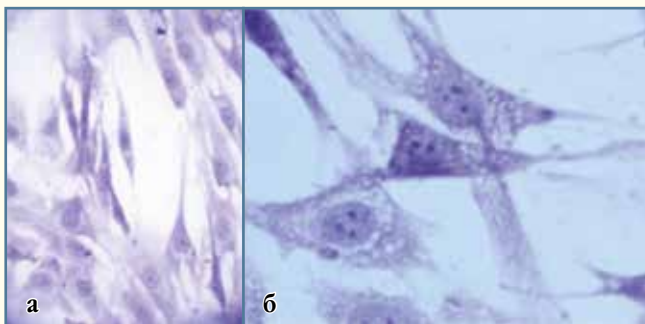


Рис. 9

Иммуногистохимические реакции на белки: **а** – коллаген типа I (green); **б** – коллаген типа II (red); **в** – агрекан (red); **г** – Sox9 (red)

**Рис. 10**

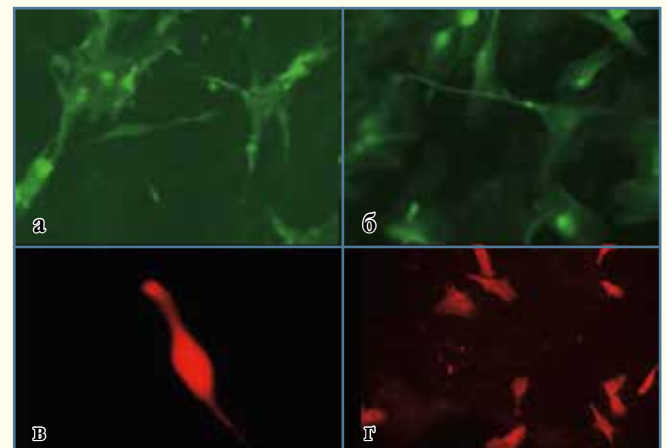
Клетки нейрального генеза в культуре клеток вогнутой стороны (нативный препарат 10 × 40)

**Рис. 11**

Культура клеток (идиопатический сколиоз, вогнутая сторона на вершине деформации); окраска по Нисслю: **а** – ув. 400; **б** – ув. 200

мирующих связи. В отростках и клетках, окрашивающихся по Гомери и Кохалу, экспрессировались глиальные белки (рис. 14, 15). Этот тип клеток по морфологическим и ультраструктурным данным отнесен к глиобластам. Данные сканирующей электронной микроскопии клеток, полученных из пластинки роста вогнутой стороны деформации, показывают, что клетки имеют вытянутую форму и длинные отростки, формирующие контакты. Между клетками сформированы синапс и крупный шипик. В цитоплазме клеток и отростках присутствуют плотные гранулы от 300 до 500 нм в диаметре; многочисленные шипики на отростках нейронов (ненасыщенный препарат; рис. 16, 17).

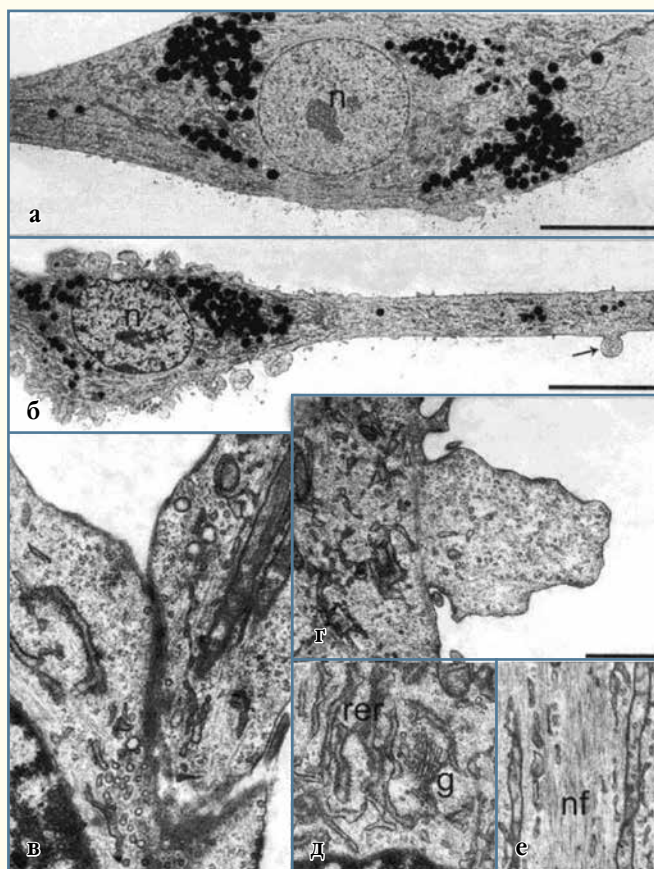
Естественно, возникает вопрос: каким образом клетки нейрального генеза могли быть локализованы в пластинке роста больных идиопатическим сколиозом? Для ответа на этот вопрос следует обратиться к ранним стадиям эмбриогенеза.

**Рис. 12**

Иммуногистохимические реакции на нейральные антитела в культивированных клетках вогнутой стороны деформации позвоночника (идиопатический сколиоз): **а, б** – *NF1* (green); **в** – *IIIβ-tubuline* (red); **г** – *NF200* (red)

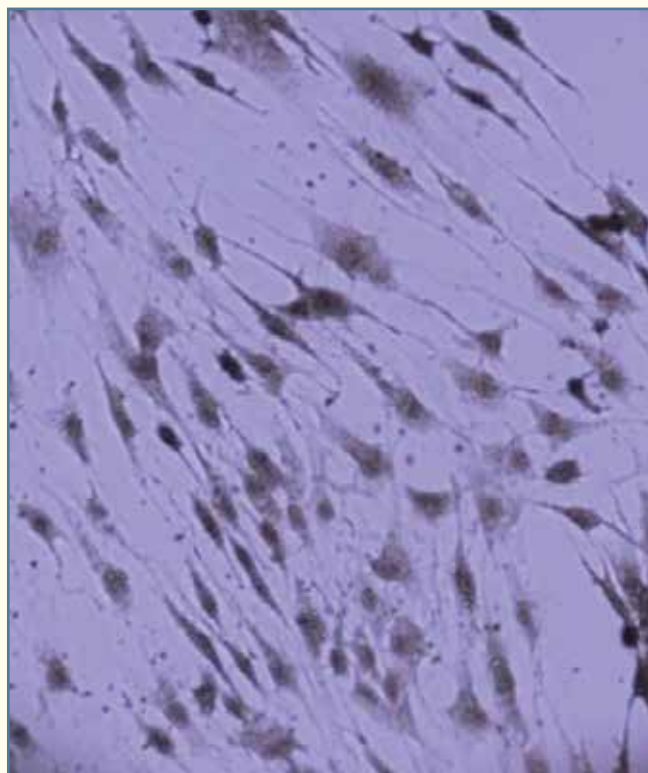
Известно, что позвоночник формируется из мезенхимы [31]. Вместе с тем на стадии формирования нервной трубки из нее отделяются клетки нервного гребня, которые мигрируют по трем путям [32, 33].

Один из путей миграции клеток нервного гребня – это туловищный путь, который проходит через передний (роstralный) отдел склеротома, и в конечном итоге эти клетки формируют чувствительные ганглии [34]. Мигрирующие клетки претерпевают эпителиомезенхимальную трансформацию путем переключения экспрессии нейральных белков клеточной адгезии на белки мезенхимной адгезии [35].

**Рис. 13**

Микрофотография культивированных клеток, выделенных из пластинки роста тела позвонка (вогнутая сторона вершины деформации) больного идиопатическим сколиозом: **а, б** – нейроноподобные клетки вытянутой формы и с длинным отростком (аксоном): многочисленные электронно-плотные гранулы вокруг ядер (n) и в цитоплазме клеток, формирующиеся на аксонах шипики (стрелка); **в** – фрагмент цитоплазмы одной из клеток культуры с развитым шероховатым эндоплазматическим ретикулом и комплексом Гольджи (g); **г** – фрагмент аксона, с обширной сетью нейрофиламентов (nf), пронизывающих отростки клеток, а также вытянутые митохондрии (стрелки); **д** – формирующийся контакт между отростком одной клетки и телом другой; многочисленные везикулы в месте контакта (стрелки); шипики, формирующиеся на теле и отростках клеток; масштаб: **а, б** – 10 мкм, **в–е** – 1 мкм

Клетки нервного гребня, округляясь, приобретают фенотип мезенхимальных клеток и не отличаются от окружающих [36]. Этот процесс обусловлен последующей миграцией клеток нервного гребня по мезенхимальному субстрату, выстилающему путь от нервной трубки к сомитам. Формирование субстрата связано с экспрессией гена *PAX3* и синтезом двух изоформ версикана (V1, V0) [37]. Траектория движения клеток нервного гребня определяется асимметричным распределением факторов индукции (V0, V1 вер-

**Рис. 14**

Культура клеток (идиопатический сколиоз, вогнутая сторона на вершине деформации); окраска по Кахалу, ув. 200

сиканы) и ингибиции [38]. Ингибирование движения клеток нервного гребня осуществляется высокополимерным протеогликаном агреканом, что связано с ограничением диспергирования клеток нервного гребня за счет боковых цепей ГАГ [39]. В процессе миграции клеток нервного гребня происходит хондрогенная дифференцировка мезенхимальных клеток в склеротоме. Эти данные свидетельствуют о взаимозависимости процессов хондро- и ганглиогенеза [40]. Более того, удаление склеротома влечет за собой неспособность к формированию чувствительных ганглиев, а нарушение сегментации склеротома приводит к формированию уродливых ганглиев [41]. Следовательно, миграция клеток нервного гребня через склеротом – закономерность и, более того, наблюдается сопряженная во времени регуляция морфогенеза позвоночника и чувствительных ганглиев [42].

Миграция клеток нервного гребня через склеротом – это один из этапов формирования позвоночника и чувствительных ганглиев. С учетом тропизма этих двух структур остается неясным, в какой мере нарушается функция чувствительных ганглиев при идиопатическом сколиозе. Ответ на этот вопрос ждет своих исследователей. Наличие клеток, производных нервного гребня в пластинке роста тела позвонка больных идиопатическим сколиозом, является, несомненно, нарушением одного из этапов морфогенеза позвоночника.

Надо полагать, что в результате нарушения пространственно-временных закономерностей миграции клеток нервного гребня часть из них оседает и депонируется в склеротоме. Это может происходить в результате мутации гена *PAX3* с последующим нарушением синтеза версиканов вдоль миграционного пути [37]. Подобные данные были подтверждены исследованиями Krull [42]. Нарушение

секреции и ингибирование сульфатирования версиканов приводили к остановке миграции клеток нервного гребня. Известно, что взаимодействие клеток нервного гребня с интерстициальным матриксом осуществляется по принципу «клетка – клетка – матрикс» [43]. Любые нарушения синтеза и/или взаимодействия рецептора (интегрина) клеток нервного гребня с молекулами миграционного субстрата

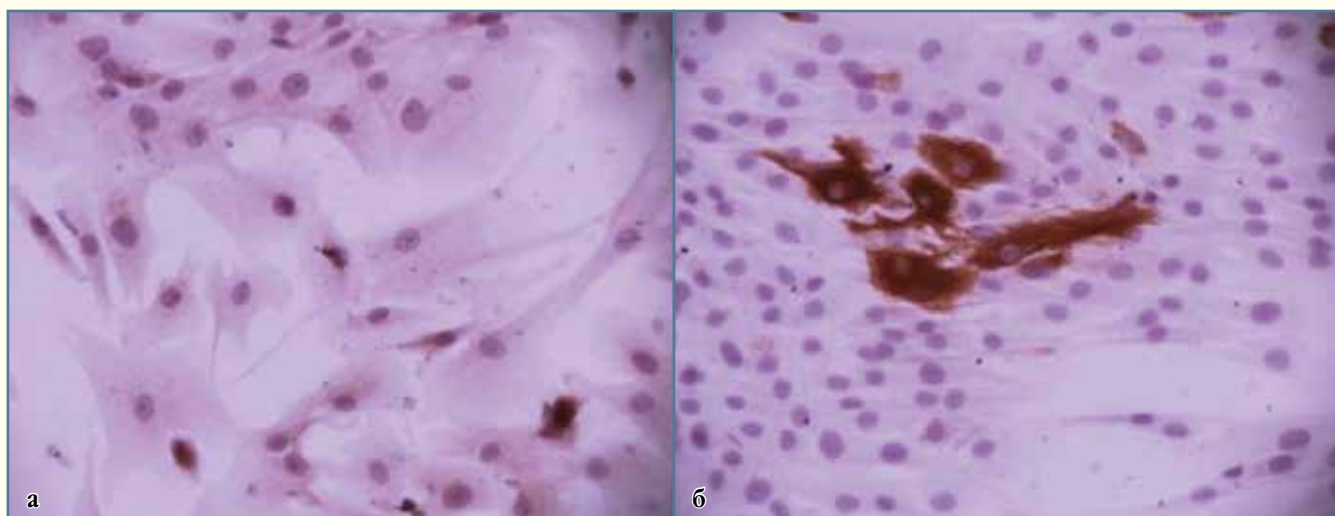


Рис. 15

Иммуногистохимические реакции на глиальные белки: **а** – S-100 астроцитарный белок, ув. 200; **б** – GFAP – глиальный белок, ув. 200

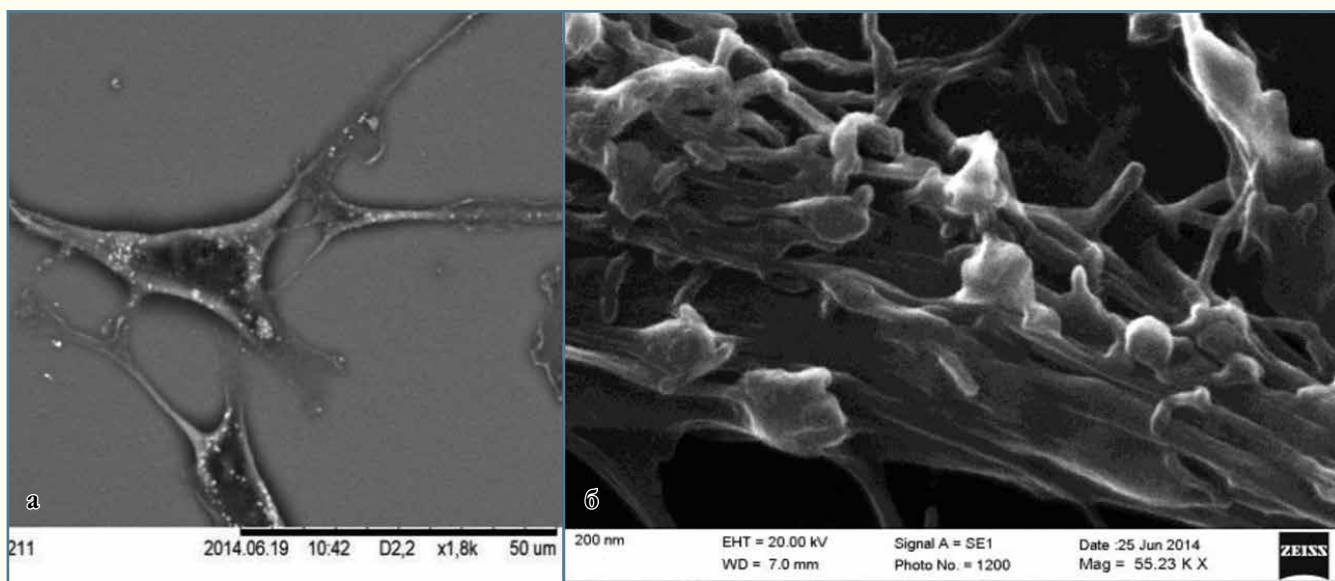
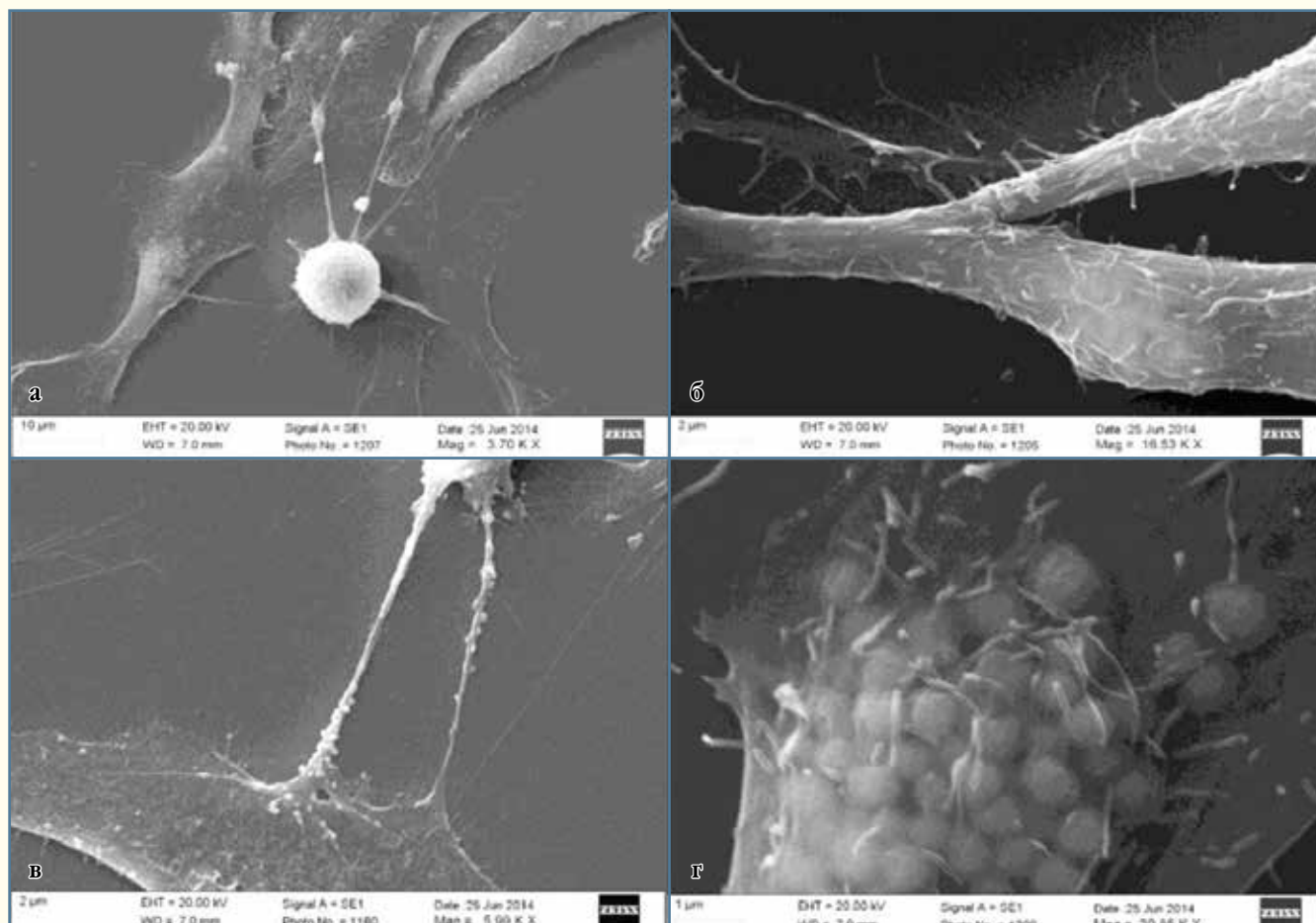


Рис. 16

Сканирующая микроскопия. Нейроны в культуре клеток, полученной из пластинки роста тела позвонка (вогнутая сторона вершины деформации) больного идиопатическим сколиозом (ненапыленный препарат): общий вид клеток на малом увеличении; клетки имеют вытянутую форму и длинные отростки; сформированные контакты между двумя клетками; видны синапс и крупный шипик; в цитоплазме нейронов, а также в отростках присутствуют небольшие плотные гранулы от 300 до 500 нм в диаметре; масштабная линейка составляет 200 мкм (**а**), 50 мкм (**б**)

**Рис. 17**

Сканирующая микроскопия. Вид нейронов в культуре клеток, полученной из пластинки роста тела позвонка (вогнутая сторона вершины деформации) больного идиопатическим сколиозом в сканирующем электронном микроскопе (напыленный препарат): **а** – общий вид клеток; **б** – фрагмент отростка нейрона на большом увеличении; **в** – отросток нейрона (аксон) с шипиками; **г** – фрагмент нейрона на большом увеличении, поверхность содержит короткие отростки, через плазматическую мембрану просвечивают содержащиеся в цитоплазме гранулы; масштабная линейка составляет 1 мкм (**а**), 2 мкм (**б–г**)

могут быть причиной нарушения дальнейших морфогенетических событий в склеротоме [34].

Ингибирование миграции клеток нервного гребня может быть связано со многими факторами, но в таком случае возникает вопрос: почему в пластинках роста тел позвонков, в зонах депонирования клеток нервного гребня определяются малодифференцированные хондробласты? Известно, что клетки нервного гребня на месте своей конечной миграции приобретают фенотип клеток той среды, в которую они мигрируют, но генотип соответствует исходному [44]. Вполне объяснимо, что клетки нейрогенного ряда, располагаясь в пластинках роста тел позвонков, не детерминированы к процессу роста. Этим объясняется отсутствие хондрогенной дифференцировки клеток в пластинке роста, что приводит к асимметрии и локальному нарушению роста с последующим формированием деформации позвоночника. В конечном итоге

заложенные в эмбриогенезе нарушения морфогенеза позвоночника в периодах роста реализуются в сколиотическую болезнь со всеми присущими клиническими и морфологическими признаками.

Таким образом, анализ дифференцированного культивирования клеток пластинок роста тел позвонков 50 больных идиопатическим сколиозом III–IV ст. позволил обнаружить причины нарушения роста и формирования деформации позвоночника и высказать предположение о вариабельности клинических проявлений идиопатического сколиоза в зависимости от степени нарушения, морфогенетических процессов в пластинке роста тела позвонка.

На основании полученных собственных и литературных данных представляется возможным высказать некоторые предположения о вариабельности клинических проявлений сколиотической болезни. Прежде всего,

о причинах прогрессирования деформации позвоночника и преимущественном формировании искривления грудного отдела позвоночника при идиопатическом сколиозе. Так как миграция клеток нервного гребня осуществляется с интервалами 10–1 μ и расстояние между ними составляет один диаметр клетки [45], количество депонированных клеток может быть разным, что и определяет степень нарушения хондрогенеза и асимметрию роста. При незначительном количестве депонированных клеток на стадии интенсивного роста (I фаза роста) возникает деформация позвоночника, которая в последующем нивелируется за счет неизменной пластинки роста или остается на начальной стадии развития (I–II ст. идиопатического сколиоза). Эти данные основываются на предыдущих экспериментальных исследованиях А.М. Зайдман (неопубликованные данные). При точечном повреждении пластинки роста у растущего животного возникала незначительная деформация, которая в последующем в процессе линейного роста нивелировалась и не прогрессировала. При повреждении половины пластинки роста у животного возникала выраженная деформация, прогрессирующая до окончания роста. Один из необъяснимых вопросов вертебрологии – причины преимущественного формирования деформации грудного отдела позвоночника при идиопатическом сколиозе. Ответ на этот вопрос может быть получен из анализа траектории миграции клеток нервного гребня. В связи с тем, что миграция клеток нервного гребня по туловищному пути проходит только через грудные сомиты, нарушение движения и депонирование клеток реализуются в асимметрии роста и формировании деформации именно грудного отдела позвоночника. Преимущественное поражение идиопатическим сколиозом девочек, надо полагать, связано с более ранним развитием девочек, чем мальчиков.

Таким образом, анализ дифференцированного культивирования клеток пластинки роста тела позвонка 50 больных идиопатическим сколиозом III–IV ст. позволил обнаружить причины нарушения роста и формирования деформации позвоночника и высказать предположение о вариабельности клинических проявлений идиопатического сколиоза в зависимости от степени нарушения, морфогенетических процессов в пластинке роста тела позвонка.

Можно сделать следующие выводы:

1) этиологическим фактором сколиотической болезни является эктопическая локализация в пластинке роста тела позвонка клеток, производных нервного гребня, генетически не детерминированных к хондрогенной дифференцировке и к процессу роста;

2) локальное нарушение хондрогенеза в пластинке роста тела позвонка больных идиопатическим сколиозом является причиной асимметрии роста и формирования деформации позвоночника при идиопатическом сколиозе;

3) степень структурных изменений позвоночника и прогноз прогрессирования деформации зависят от уровня нарушения морфогенетических процессов в пластинке роста тела позвонка, заложенных в эмбриогенезе.

В разделе исследований автора представлены данные, на основании которых сформулированы этиология и патогенез идиопатического сколиоза. Предложены гипотезы: причины прогрессирования деформаций позвоночника, преимущественное образование грудного сколиоза и приоритет заболеваемости девочек по отношению к мальчикам. Многие вопросы нуждаются в подтверждении, что побудило к продолжению исследований на созданной модели идиопатического сколиоза.

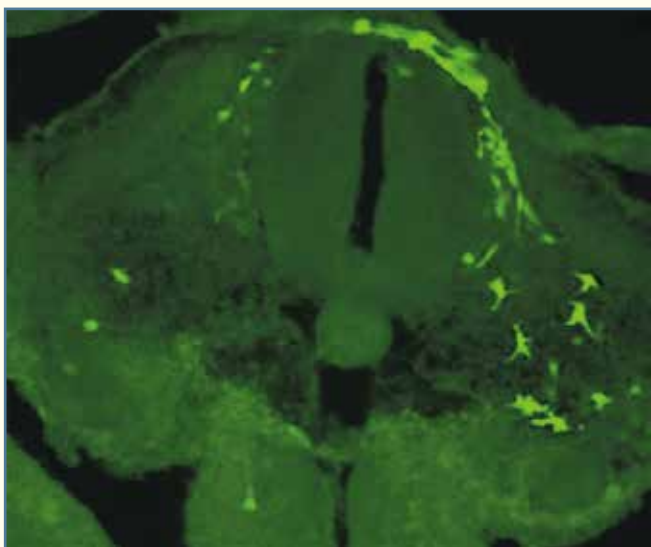
Модель идиопатического сколиоза путем ингибирования гена *PAX3* в склеротоме куриного эмбриона

Этиологическим фактором идиопатического сколиоза является эктопическая локализация в пластинке роста тела позвонка клеток, производных нервного гребня, генетически не детерминированных к хондрогенной дифференцировке и процессу роста [29]. Нарушение морфогенеза позвоночника в раннем эмбриогенезе реализуется в сколиотическую деформацию с клиническими вариантами течения. Для ответа на сформулированные гипотезы создана модель идиопатического сколиоза на курином эмбрионе путем ингибирования экспрессии *PAX3* гена интерферирующими siRNA в склеротоме. SiRNA представлена лабораторией химии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Эксперименты проводили на фертильных яйцах породы кур Hubbard ISA F15.

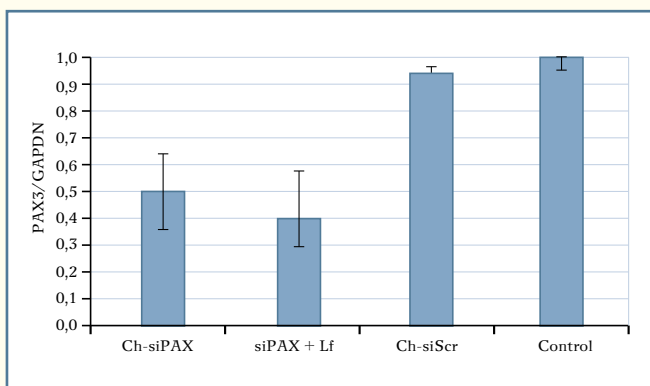
Первым этапом были идентифицированы клетки нервного гребня в склеротоме куриного эмбриона. Через 44–48 ч инкубации оплодотворенных яиц в спинно-мозговую трубку эмбриона методом электропорации вводили плазмиды с меткой GFP (рис. 18).

Вторым этапом методом ПЦР в режиме реального времени определяли возможность ингибирования экспрессии гена *PAX3* в культуре фибробластов куриного эмбриона холестеринсодержащей нуклеазоустойчивой siRNA, способной проникать в клетки без трансфекционного агента (рис. 19). Выбор последовательности siRNA соответствовал последовательности матричной РНК (мРНК) гена *PAX3*. В качестве контрольной РНК использовали siRNA, не имеющую значимой гомологии с мРНК человека и кур (антисмысловая РНК).

Третий этап – установлена возможность ингибирования экспрессии гена *PAX3* в организме эмбриона цыпленка на стадии локализации клеток нервного гребня в склеротоме. Через 44 ч инкубации оплодотворенных яиц в нервную трубку куриного эмбриона вводили липофильную siRNA для подавления экспрессии гена *PAX3* в скле-

**Рис. 18**

Клетки нервного гребня, меченые плазмидой с GFP, в склеротоме куриного эмбриона на стадии 11 по Гамбургер – Гамильтон (42–44 ч эмбрионального развития), ув. 200

**Рис. 19**

Ингибирование экспрессии гена *PAX3* липофильными siRNA в культуре фибробластов эмбриона цыпленка с помощью qRT-PCR: Ch-siPAX – siRNA к гену *PAX3*, siPAX + Lf – siRNA к гену + Lipofektamin, Ch-siScr – случайная последовательность siRNA, Control – контроль

ротоме (рис. 20). В контрольной серии использовали антисмысловую siRNA.

Механизм ингибирования экспрессии гена *PAX3* следующий: siRNA проникает в цитоплазму клетки и через ряд последовательных этапов расщепляет мРНК мишени. Расщепленная мРНК деградирует. В результате в клетке снижается концентрация мРНК мишени и перестает синтезироваться *PAX3* белок, регулятор миграции клеток нервного гребня. Миграция прекращается, клетки нервного гребня депонируются в склеротоме (зачатке

**Рис. 20**

Куриный эмбрион на стадии 42–44 ч инкубирования (введение липофильной siRNA в нервную трубку), ув. 200

**Рис. 21**

Внешний вид цыпленка после вылупления (21-е сут эксперимента)

**Рис. 22**

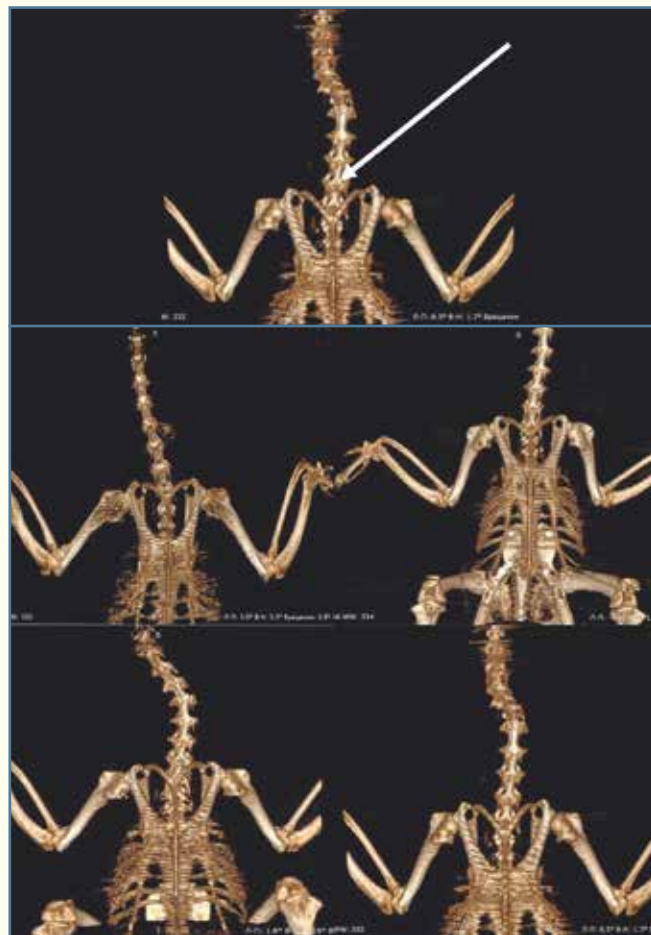
Внешний вид цыплят с ингибированием экспрессии гена *PAX3* через 8 сут после вылупления

**Рис. 23**

Через 36 сут после вылупления у цыплят при пальпации отмечается деформация в шейно-грудном отделе позвоночника

формирующегося позвоночника). В процессе развития позвоночника образуется сколиотическая деформация.

Яйца инкубировали при температуре 38 °С, влажность 55 % до вылупления (21 сут). Через 8 сут после вылупления при осмотре и пальпации в шейно-грудном отделе определяется деформация позвоночника (рис. 21, 22). Через 169 дней установлены S-образные деформации в шейно-грудном отделе позвоночника (рис. 23). На уровне II–III шейных позвонков определяется клиновидная деформация (рис. 24). Морфологические, генетические и ультраструктурные исследования в настоящее время продолжаются.

**Рис. 24**

Компьютерная томография курицы в возрасте 169 дней

Литература/References

1. Эйнштейн А., Инфельд Л. Эволюция физики. Развитие идей от первоначальных понятий до теории относительности и квантов. М., 1965. [Einstein A, Infeld L. The Evolution of Physics. The Growth of Ideas from Early Concepts to Relativity and Quanta. Transl. from English. Moscow, 1965. In Russian].
2. Burwell RG, Dangerfield PH, Freeman BJ. Concepts on the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. Bone growth and mass, vertebral column, spinal cord, brain, skull, extra-spinal left-right skeletal length asymmetries, disproportions and molecular pathogenesis. Stud Health Technol Inform. 2008;135:3–52.
3. Burwell RG, Dangerfield PH, Moulton A, Grivas TB. Adolescent idiopathic scoliosis (AIS), environment, exposome and epigenetics: A molecular perspective of post-natal normal spinal growth and the etiopathogenesis of AIS with consideration of a network approach and possible implications for medical therapy. Scoliosis. 2011;6:26. DOI: 10.1186/1748-7161-6-26.
4. Дудин М.Д., Пинчук Д.Ю. Идиопатический сколиоз: нейрофизиология, нейробиохимия. СПб., 2013. [Dudin MG, Pinchuk DY. Idiopathic Scoliosis: Neurophysiology, Neurochemistry. St. Petersburg, 2013. In Russian].
5. Валетдинова К.Р. Применение системы CRISPR/Cas9 для создания и исследования клеточных моделей наследственных заболеваний человека // Гены и клетки. 2016. Т. XI. № 2. С. 10–20. [Valetdinova KR. Application of CRISPR/Cas9 system for developing and studying cellular models of inherited disease. Genes & Cells. 2016;XI(2):10–20. In Russian].
6. Axenovich TI, Zaidman AM, Zorkoltseva IV, Tregubova IL, Borodin PM. Segregation analysis of idiopathic scoliosis: demonstration of a major gene effect. Am J Med Genet. 1999;86:389–394. DOI: 10.1002/(SICI)1096-8628(19991008)86:4<389::AID-AJMG15>3.0.CO;2-D.
7. Зайдман А.М., Корель А.В., Сахаров А.В., Рыкова В.И. Структурно-функциональные особенности пластинки роста тела позвонка человека при идиопатическом сколиозе // Хирургия позвоночника. 2004. № 2. С. 64–73. [Zaidman AM, Korel AV, Sakharov AV, Rykova VI. Structural and functional features of human vertebral body growth plate in idiopathic scoliosis. Hir. Pozvonoc. 2004;(2):64–73. In Russian].
8. Kornak U, Mundlos S. Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. Am J Hum Genet. 2003;73:447–474. DOI: 10.1086/377110.
9. Miller NH, Marosy B, Justice CM, Novak SM, Tang EY, Boyce P, Pettengill J, Doheny KF, Pugh EW, Wilson AF. Linkage analysis of genetic loci for kyphoscoliosis on chromosomes 5p13, 13q13.3, and 13q32. Am J Med Genet A. 2006;140:1059–1068. DOI: 10.1002/ajmg.a.31211.

10. Marosy B, Justice CM, Vu C, Zorn A, Nzegwu N, Wilson AF, Miller NH. Identification of susceptibility loci for scoliosis in FIS families with triple curves. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:846–855. DOI: 10.1002/ajmg.a.33222.
11. Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev*. 2000;14:627–644. DOI: 10.1101/gad.14.6.627.
12. Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol*. 2001;187:265–276. DOI: 10.1002/jcp.1080.
13. Zhang X, Siclari VA, Lan S, Zhu J, Koyama E, Dupuis HL, Enomoto-Iwamoto M, Beier F, Qin L. The critical role of the epidermal growth factor receptor in endochondral ossification. *J Bone Miner Res*. 2011;26:2622–2633. DOI: 10.1002/jbmr.502.
14. Gevers EF, van der Eerden BC, Karperien M, Raap AK, Robinson IC, Wit JM. Localization and regulation of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein in the rat growth plate. *J Bone Miner Res*. 2002;17:1408–1419. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.8.1408.
15. Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O, Lindahl A. Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:9826–9830. DOI: 10.1073/pnas.89.20.9826.
16. Ballock RT, O Keefe RJ. The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85:715–726.
17. Topol L, Chen W, Song H, Day TF, Yang Y. Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting catenin phosphorylation in the nucleus. *J Biol Chem*. 2009;284:3323–3333. DOI: 10.1074/jbc.M808048200.
18. Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J*. 1998;17:5718–5733. DOI: 10.1093/emboj/17.19.5718.
19. Peters H, Wilm B, Sakai N, Imai K, Maas R, Balling R. Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. *Development*. 1999;126:5399–5408.
20. Rodrigo I, Hill RE, Balling R, Munsterberg A, Imai K. Pax1 and Pax9 activate Bapx1 to induce chondrogenic differentiation in the sclerotome. *Development*. 2003;130:473–482. DOI: 10.1242/dev.00240.
21. Kobayashi T, Chung UI, Schipani E, Starbuck M, Karsenty G, Katagiri T, Goad DL, Lanske B, Kronenberg HM. PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development*. 2002;129:2977–2986.
22. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*. 1996;273:613–622. DOI: 10.1126/science.273.5275.613.
23. Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, Pihlajamäa T, Ala-Kokko L, Heinegard D, Paulsson M, Maurer P. Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J Biol Chem*. 2001;276:6083–6092. DOI: 10.1074/jbc.M009512200.
24. Aspberg A. The different roles of aggrecan interaction domains. *J Histochem Cytochem*. 2012;60:987–996. DOI: 10.1369/0022155412464376.
25. Karniski LP. Mutations in the diastrophic dysplasia sulfatetransporter (DTDST) gene: correlation between sulfate transport activity and chondrodysplasia phenotype. *Hum Mol Genet*. 2001;10:1485–1490. DOI: 10.1093/hmg/10.14.1485.
26. Rossi A, Superti-Furga A. Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene (SLC26A2): 22 novel mutations, mutation review, associated skeletal phenotypes, and diagnostic relevance. *Hum Mutat*. 2001;17:159–171. DOI: 10.1002/humu.1.
27. James CG, Stanton LA, Agoston H, Ulici V, Underhill TM, Beier F. Genome wide analyses of gene expression during mouse endochondral ossification. *PLoS One*. 2010;5:e8693. DOI: 10.1371/journal.pone.0008693.
28. Song YQ, Karasugi T, Cheung KMC, Chiba K, Ho DWH, Miyake A, Kao PYP, Sze KL, Yee A, Takahashi A, Kawaguchi Y, Mikami Y, Matsumoto M, Togawa D, Kanayama M, Shi D, Dai J, Jiang Q, Wu C, Tian W, Wang N, Leong JCY, Luk KDK, Yip S, Cherny SS, Wang J, Mundlos S, Kelempisioti A, Eskola PJ, Mannikko M, Makela P, Karppinen J, Jarvelin MR, O'Reilly PF, Kubo M, Kimura T, Kubo T, Toyama Y, Mizuta H, Cheah KSE, Tsunoda T, Sham PC, Ikegawa S, Chan D. Lumbar disc degeneration is linked to a carbohydrate sulfotransferase 3 variant. *J Clin Invest*. 2013;123:4909–4917. DOI: 10.1172/JCI69277.
29. Zaydman AM, Stroková EL, Kiseleva EV, Suldina IA, Strunov AA, Shevchenko AI, Laktionov PP, Subbotin VM. A new look at etiological factors of idiopathic scoliosis: neural crest cells. *Int J Med Sci*. 2018;15:436–446. DOI: 10.7150/ijms.22894.
30. Зайдман А.М., Строкова Е.Л., Новиков В.В., Вастора А.С., Михайловский М.В., Садовой М.А. Экспрессия генов в хондроцитах пластинки роста у пациентов с идиопатическим сколиозом // Хирургия позвоночника. 2014. № 4. С. 88–98. [Zaidman AM, Stroková EL, Novikov VV, Vasyura AS, Mikhailovsky MV, Sadovoy MA. Gene expression in growth plate chondrocytes of patients with idiopathic scoliosis. *Hir. Pozvonoc*. 2014;(4):88–98. In Russian]. DOI: 10.14531/ss2014.4.88-98.
31. Кноппе А.Г. Эмбриональный гистогенез. Л., 1971. [Knorre AG. Embryonic Histogenesis. Leningrad, 1971. In Russian].
32. Карлсон Б.М. Основы эмбриологии по Пэттену. М., 1983. [Carlson BM. Patten's Foundations of Embryology. Transl. from English, ed. by B.V. Konyukhov. Moscow, 1983. In Russian].
33. Токни Б.П. Общая эмбриология. М., 1977. [Tokin BP. General Embryology. Moscow, 1977. In Russian].
34. Roffers-Agarwal J, Gammill LS. Neuropilin receptors guide distinct phases of sensory and motor neuronal segmentation. *Development*. 2009;136:1879–1888. DOI: 10.1242/dev.032920.
35. Bronner-Fraser M, Garc a-Castro M. Manipulations of neural crest cells or their migratory pathways. *Methods Cell Biol*. 2008;87:75–96. DOI: 10.1016/S0091-679X(08)00204-5.
36. Peris R, Perissinotto D. Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech Dev*. 2000;95:3–21. DOI: 10.1016/S0925-4773(00)00365-8.
37. Henderson DJ, Ybot-Gonzalez P, Copp AJ. Over-expression of the chondroitin sulphate proteoglycan versican is associated with defective neural crest migration in the *Pax3* mutant mouse (splotch). *Mech Dev*. 1997;69:39–51. DOI: 10.1016/S0925-4773(97)00151-2.
38. McGonnell IM, Graham A. Trunk neural crest has skeletogenic potential. *Curr Biol*. 2002;12:767–771. DOI: 10.1016/S0960-9822(02)00818-7.
39. Pettway Z, Domowicz M, Schwartz NB, Bronner-Fraser M. Age-dependent inhibition of neural crest migration by the notochord correlates with alteration in the S103L chondroitin sulfate proteoglycan. *Exp Cell Res*. 1996;255:195–206. DOI: 10.1006/excr.1996.0170.
40. Le Douarin NM, Teillet MA. Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neuroectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev Biol*. 1974;41:162–184. DOI: 10.1016/0012-1606(74)90291-7.
41. Bundy J, Rogers R, Hoffman S, Conway SJ. Segmental expression of aggrecan in the non-segmented perinotochordal sheath underlies normal segmentation of the vertebral column. *Mech Dev*. 1998;79:213–217. DOI: 10.1016/S0925-4773(98)00179-8.
42. Krull CE. Inhibitory interactions in the patterning of trunk neural crest migration. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;857:13–22. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10103.x.
43. Erickson CA, Perris R. The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. *Dev Biol*. 1993;159:60–74. DOI: 10.1006/dbio.1993.1221.
44. Logan M, Martin JF, Nagy A, Lobe C, Olson EN, Tabin CJ. Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a *Px1* enhancer. *Genesis*. 2002;33:77–80. DOI: 10.1002/gene.10092.
45. Krull CE, Collazo A, Fraser SE, Bronner-Fraser M. Segmental migration of trunk neural crest: time-lapse analysis reveals a role for PNA-binding molecules. *Development*. 1995;121:3733–3743.

Адрес для переписки:

Зайдман Алла Михайловна
630091, Россия, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,
Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии
им. Я.Л. Цивьяна,
AZaydman@niito.ru

Статья поступила в редакцию 09.07.2020

Подписано в печать 20.07.2020

Address correspondence to:

Zaidman Alla Mikhailovna,
Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics
n.a. Ya.L. Tsivyan,
17 Frunze str., Novosibirsk, 630091, Russia,
AZaydman@niito.ru

Received 09.07.2020

Passed for printing 20.07.2020

Алла Михайловна Зайдман, д-р мед. наук, проф., заслуженный деятель науки Российской Федерации, главный научный сотрудник, руководитель отдела теоретических исследований вертебральной патологии и морфологии, Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна, ул. Фрунзе, 17, 630091, Новосибирск, Россия, ORCID: 0000-0002-6613-1615, AZaydman@niito.ru.

Alla Mikhailovna Zaidman, DMSc, Prof., chief researcher, Honored Scientist of the Russian Federation, Head of the Department of theoretical research in vertebral pathology and morphology, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan, 17 Frunze str., Novosibirsk, 630091, Russia, ORCID: 0000-0002-6613-1615, AZaydman@niito.ru.